

ウシ副腎髄質におけるプロスタグランジンE受容体とその情報伝達機構に関する研究

著者	横濱 廣光
号	301
発行年	1989
URL	http://hdl.handle.net/10097/15865

氏 名（本籍） ^{よこ}横 ^{はま}濱 ^{ひろ}廣 ^{みつ}光

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 3 0 1 号

学位授与年月日 平成元年 1 1 月 2 2 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 ウシ副腎髄質におけるプロスタグランジンE
受容体とその情報伝達機構に関する研究

論文審査委員 (主 査)
教授 南 原 利 夫 教授 橋 本 嘉 幸
教授 佐 藤 進

論文内容要旨

プロスタグランジン（以後PGと略す）はアラキドン酸を前駆体として生合成される生理活性物質であり、主な作用として子宮筋収縮、血圧降下、胃酸分泌抑制、血小板凝集抑制、脂肪分解抑制などがこれまでに報告されている。また研究の遅れていた脳についても最近、体温、睡眠、痛覚等の調節にPGが関与していることが明らかにされつつある。これらPGの作用は、脂肪細胞にPGE₁/E₂に対する特異的な結合能が報告されたことから、多くのホルモンや神経伝達物質と同様、細胞膜上の受容体を介するものと考えられている。しかし、PGの構造上の不安定さと共に、特異的なアンタゴニストが見い出されていないことなどから、PG受容体に関する研究は他のホルモン受容体に比べ、はるかに立ち遅れているのが現状である。例えば、PGE受容体にサブタイプがあるかどうか未だ不明である。また、PGEの情報伝達機構は一般にcAMPを介するとされているが、平滑筋の収縮や弛緩、あるいは分泌反応などCa²⁺が関与していると考えられる作用では、その作用機構の不明確さが指摘されている。

一方、副腎髄質は発生学的に交感神経の節後神経に相同し、カテコールアミン（アドレナリン、ノルアドレナリン）の合成、貯蔵、分泌を主な機能としている。Karaplis, Powellらはウシ副腎髄質にPGE₁/E₂に特異的な結合能を見出し、ウシ副腎髄質がPGE受容体研究に適した臓器であることを報告している。また、PGE₂はcAMPの産生を抑制することによりカテコールアミン分泌を抑制するとされているが、報告によって矛盾する点も多く見受けられる。

以上のような経緯から今回、ウシ副腎髄質を用いPGE受容体の性質を明らかにすると共に、PGEのカテコールアミン分泌におよぼす作用、さらにその受容体を介する情報伝達機構の解明を目的として本研究に着手した。

ウシ副腎髄質におけるPGE受容体のキャラクタリゼーション

ウシ副腎髄質にはPGEに特異的な受容体が存在し、各PGに対する結合能はPGE₁/E₂ > PGF₂α > PGD₂の順であることが報告されている。今回、ウシ副腎髄質の100,000xg沈渣膜画分を材料として、PGE受容体の特性について検討した。

[³H] PGE₂と結合した受容体は、結合能を保持したまま3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acidにより可溶化することができた。可溶化画分の結合型 [³H] PGE₂はguanosine triphosphate（以後GTPと略す）添加により解離が促進され、また小麦胚芽レクチンカラムに特異的に吸着された受容体においてGTP処理により [³H] PGE₂の大部分はカラムから溶出されてしまうことから、PGE受容体はGTP結合蛋白質（以後G蛋白質と略す）と関連していることが示唆された。

一方、膜画分を二価性架橋剤dithio-bis(succinimidyl propionate)で処理すると、結合した $[^3\text{H}] \text{PGE}_2$ はGTP処理してももはや解離しなくなることから、受容体とG蛋白質は、安定な高親和性複合体を形成したものと考えられる。両者の共有結合による安定な複合体の形成は、 $[^3\text{H}] \text{PGE}_2$ 結合能と $[^{35}\text{S}] \text{GTP } \gamma\text{S}$ 結合能が共にGTP-Sepharoseカラムに吸着後同じ位置に溶出されること、およびG蛋白質の α , β サブユニットに対する抗体と反応することから確認することができた。このようにして形成された受容体-G蛋白質複合体は、ゲル濾過において分子量約200,000の位置に単一ピークとして溶出されることから、G蛋白質の分子量を約90,000と仮定するとPGE受容体の分子量は約110,000と推定することができる。さらに $[^3\text{H}] \text{PGE}_2$ は、膜画分を百日咳毒素で処理しても遊離してこないことから、PGE受容体と連関するG蛋白質は百日咳毒素の基質にはならないことが判明した。

PGEの特異的なアンタゴニストが得られていない現在、アゴニストを用いるPGE受容体の精製を企てる場合には、 $[^3\text{H}] \text{PGE}_2$ の高親和性結合能を維持したまま精製することが重要と考えられる。この点から二価性架橋剤により受容体-G蛋白質を比較的安定な複合体として精製する今回の試みは、今後の研究において有用な手段になると思われる。

培養クロマフィン細胞からのカテコールアミン分泌に対するPGEの作用

PGE_2 のカテコールアミン分泌に対する作用を、培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞を用いて検討した。 PGE_2 は、それ自身カテコールアミン分泌を促進せず、またニコチン、アセチルコリン、および K^+ によるカテコールアミン分泌を $100 \mu\text{M}$ の高濃度でも抑制しない。

一方、 PGE_2 は Na^+ 、 K^+ -ATPaseの阻害剤ウワバインと同時に添加することにより、顕著なカテコールアミン分泌を促した。この分泌能は、ニコチンのように一過性のものではなく持続的に見られ、30分では細胞内含量の約30%のカテコールアミンが分泌された。PG類のカテコールアミン分泌能の強さは $\text{PGE}_1/\text{E}_2 > \text{PGF}_2 \alpha > \text{PGD}_2$ の順であり、 PGE_2 の代謝物13,14-dihydro-15-keto- PGE_2 には全く効果が見られなかった。この分泌能の順序はPGE受容体に対する親和性の順序に一致することから、 PGE_2 の作用は受容体を介するものと考えられる。

PGE_2 -ウワバインによるカテコールアミンの分泌は、細胞外 Na^+ 、 Ca^{2+} 濃度に依存し、また細胞内への $^{22}\text{Na}^+$ 、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の流入亢進が認められた。さらにこの分泌反応は、 Na^+ 、 H^+ -antiportの特異的阻害剤ミロライドにより阻害されるが、ニコチン受容体の阻害剤ヘキサメトニウムや、膜電位依存性 Na^+ チャンネルの阻害剤テトロドトキシンでは阻害を受けなかった。従って、 PGE_2 はおそらく Na^+ 、 H^+ -antiportを活性化し、ウワバインと共に細胞内への Na^+ 流入、ついで Ca^{2+} の流入を亢進することにより、カテコールアミン分泌を促すものと考えられる。

PGEの細胞内情報伝達機構

ウシ副腎髄質クロマフィン細胞におけるPGE₂の情報伝達機構と、そのカテコールアミン分泌反応との相関を検討した。PGEの細胞内情報伝達機構は一般にcAMPを介するとする報告が多いが、PGE₂は副腎髄質から調製した膜画分において、guanine nucleotideの有無にかかわらずアデニレートシクラーゼ活性に作用をおよぼさない。またクロマフィン細胞においてPGE₂はcAMPレベルを変化させることなくウバイン存在下にカテコールアミン分泌を促進するが、cAMPレベルを上昇させるホルスコリンはカテコールアミン分泌には何ら影響しないことから、PGE₂の情報伝達機構にcAMPは関与していないと考えられる。

一方、PGE₂はクロマフィン細胞においてイノシトールリン脂質代謝を亢進し、イノシトールモノー、ビスー、トリスーリン酸の産生を増加させ（2分後でそれぞれ1.4, 1.8, 1.4倍）、また明らかな細胞内Ca²⁺濃度の上昇を引き起こした。これらの作用は、PGE₂の濃度（10nM-10μM）に依存して認められ、またPGE₂に特異的であり、カテコールアミン分泌能の強さともよく一致することから受容体を介した反応と考えられる。PGE₂によるカテコールアミン分泌促進作用がイノシトールリン脂質代謝を介するという推察は、クロマフィン細胞においてイノシトールリン脂質代謝を亢進するムスカリンが、PGE₂同様カテコールアミン分泌を促進すること、プロテインキナーゼCを直接活性化するホルボールエステル（以後PMAと略す）と細胞内Ca²⁺濃度を上昇させるA-23187をウバインと共存させるとき、カテコールアミン分泌が促進されることから支持される。さらにこの結果は、イノシトールリン脂質の代謝亢進に伴ってNa⁺, H⁺-antiportが活性化されるというこれまでの報告ともよく一致している。

以上の結果、PGE₂はウバイン存在下ウシ副腎髄質クロマフィン細胞においてイノシトールリン脂質代謝を亢進し、細胞内Ca²⁺濃度を高めると共にプロテインキナーゼCを活性化することにより、カテコールアミン分泌を促すものと考えられる。

PGEによるイノシトールリン脂質代謝亢進のフィードバック調節機構

PGE₂は、クロマフィン細胞においてイノシトールリン脂質代謝を亢進し、プロテインキナーゼCを活性化すると共に、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させるが、PGE₂のこれからの作用は、プロテインキナーゼCを活性化するPMAでクロマフィン細胞を前処理するとき逆に抑制された。PMAによるこの効果は添加後1分から認められ、10分後完全に抑制した。一方、プロテインキナーゼCを活性化できない4- α -phorbol-12,13-didecanoateではイノシトールリン脂質代謝も、細胞内Ca²⁺濃度の上昇も阻害されないことから、PMAの阻害作用はプロテインキナーゼCを介したものと推察される。

PMAは、intactなクロマフィン細胞に対する [³H] PGE₂の特異的結合を阻害せず、またクロ

マフィン細胞から調製した膜画分への結合、およびそのGTP γ Sによる低親和性状態への移行も抑制しないことから、PMAの作用点はPGE₂の受容体への結合以降にあると考えられる。一方、PMAは、ムスカリンによるイノシトールリン脂質代謝亢進をPGE₂による亢進と同様に抑制するが、G蛋白質を直接活性化するNaF-AlCl₃、並びに細胞内Ca²⁺濃度を高めホスホリパーゼCを活性化するイオノマイシンによるイノシトールリン脂質代謝亢進は抑制しなかった。従って、PMA-プロテインキナーゼCの抑制作用は、受容体刺激によるイノシトールリン脂質代謝に特異的なものと考えられる。またその作用点は、PGE受容体からホスホリパーゼCへの情報伝達経路、おそらくG蛋白質のサブユニットレベルにあると推察される。

これらの結果、クロマフィン細胞におけるPGE₂の情報伝達機構は、プロテインキナーゼCを介すると共に、プロテインキナーゼCによるフィードバック機構を通して調節されることが示唆された。

以上のように、ウシ副腎髄質におけるPGE受容体の特性を明らかにすると共に、PGEがウワバイン存在下にカテコールアミン分泌を促進すること、またその情報伝達機構としてイノシトールリン脂質代謝を亢進することを明確にした。特にイノシトールリン脂質代謝の亢進は、従来のcAMPを介するという知見と共に、PGE受容体にサブタイプがあることを示唆する。今後、受容体の精製に加え、各受容体サブタイプに対するアゴニストあるいはアンタゴニストを探索することにより新しい抗炎症剤や降圧剤等の開発も期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

ウシ副腎髄質は、プロスタグランジンE (PGE) に特異的な結合能を有し、PGE受容体の存在が示唆されている。本研究は、このPGE受容体の性質を明らかにするとともに、培養のクロマフィン細胞を用い、PGEのカテコールアミン分泌に対する作用、さらに受容体を介する情報伝達機構について検討を加えたものである。

PGE受容体は糖蛋白質であり、細胞膜上でG蛋白質と連関している。受容体-G蛋白質は、二価性架橋剤で処理することにより安定な複合体を形成し、PGEに対し高親和性状態となる。また、この複合体をゲル濾過カラムにより分析した結果、PGE受容体の分子量は約110,000と推定された。

PGE₂は、Na⁺、K⁺-ATPaseの阻害剤ウバイン存在下に相乗的、かつ持続的なカテコールアミン分泌を引き起こした。この分泌反応は細胞外Ca²⁺とともに、Na⁺を必要とし、またアミロライドにより特異的に阻害されることから、PGE₂はNa⁺、H⁺-antiportを活性化しカテコールアミン分泌を引き起こすものと推測された。

また、PGE₂は、イノシトールリン酸の産生を亢進し、明らかな細胞内Ca²⁺濃度の上昇を引き起こした。さらにPGE₂と同様のカテコールアミン分泌反応は、プロテインキナーゼCを活性化するホルボールエステルとカルシウムイオノフォアによって再現されることから、副腎髄質におけるPGE₂の情報伝達機構は、イノシトールリン脂質代謝の亢進を介するものと考えられた。

PGE₂によるイノシトールリン脂質代謝の亢進及び細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、細胞をあらかじめホルボールエステル処理することにより阻害されることから、PGE₂の情報伝達機構はプロテインキナーゼCを介するとともに、プロテインキナーゼCによりフィードバック的に抑制されて完結することが示唆された。

以上、本研究は、受容体-G蛋白質を複合体として安定化させる方法を考案し、それによって従来未詳の点が多かったPG受容体の性質を明らかにするとともに、その情報伝達機構などについて数々の新知見を加えたものであり、学位を授与するに値する内容と認める。